

IMPRESION DE LAS CAPAS DE LA MEMBRANA CORIO-ALANTOIDEA *

MANUEL CUADRA **

Sumario

Hemos ideado un método simple de separación de las capas ectodérmica (corion) y entodérmica (allantois) de la membrana corio-alantoidea. Consiste en colocar, extendido, un fragmento de membrana sobre un balón de jebe lleno de agua. Se aplica golpes de aire en la superficie de la membrana con una bombilla de jebe hasta que dicha superficie pase de brillante a mate, en seguida se aplica un portaobjetos, superficie contra superficie y luego se retira violentamente quedando estampada en la superficie del vidrio la capa epitelial descada. La observación microscópica de las capas así individualizadas muestra, en vista frontal, su arquitectura histológica y los característicos detalles estructurales de las células constitutivas (citoplasma, núcleo, nucleolo, inclusiones citoplasmáticas, mitocondria, estadios de división mitótica, etc.).

INTRODUCCION

El único método conocido de estudio de la membrana corio-alantoidea, en su estructura, consiste en el examen de secciones delgadas de fragmentos convenientemente preparados por medio de las usuales técnicas histológicas (fijación, deshidratación, inclusión y sección). Las secciones son transversales no habiendo dado resultados satisfactorios los cortes frontales (Nasemann y Pohlmeier, 1957). Asimismo, los intentos de visualización de las estructuras de la membrana por medio de la observación frontal microscópica, incluso la microscopía de contraste de fase, no proporcionan información satisfactoria (Tyrrell, Tamm, Forssman y Horsfall, 1954; Tamm y Tyrrell, 1954), obviamente debido al notable grosor de la membrana y a su complejidad estructural.

* Este trabajo de investigación fue realizado en el Tropeninstitut, Hamburgo, Alemania (1958-1960) con ayuda de una beca concedida por la "Alexander von Humboldt-Stiftung".

Traducido con permiso de los editores de: Chorio-allantoic Membrane Touch Preparations. The Anatomical Record, Vol. 149, N° 3, July 1964.

** Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El nuevo método, que vamos a describir, permite la visión plena de las capas coriónica y alantoidea de la membrana, y contribuye a una mejor comprensión de su estructura y fisiología y es aplicable, por tanto, al estudio de las lesiones producidas por los diversos agentes infecciosos.

MATERIAL Y METODO

Fueron empleados huevos embrionados de gallina, de 10 a 12 días de edad. Con un lápiz y bajo transiluminación en un ovoscopio, se delimita el contorno de la zona mejor vascularizada de la membrana corioalantoidea, obteniéndose un trazo elíptico en la cáscara. Se secciona la cáscara con una tijera siguiendo el mencionado trazo, así como la membrana subyacente, obteniéndose de esta manera dos casquetes de diferente tamaño, el mayor conteniendo la zona mejor vascularizada, que es con el que vamos a trabajar.

A. *Impresión de la capa coriónica* (ectodermo)

Para obtener impresiones de la capa ectodérmica, se despega cuidadosamente el fragmento de membrana de la cáscara y se deja caer en solución de Ringer; se la coloca y se la extiende en la superficie de un balón lleno de líquido (balón de jebe), quedando expuesta al aire la superficie de la capa ectodérmica, con el balón como soporte. Se introduce el conjunto balón-membrana dentro de una cámara (Caja alta de Petri conteniendo en su interior un soporte adecuado de varilla de vidrio y formol en el fondo) saturada de vapores de formol al 40% durante un minuto. Se saca la preparación de la cámara y se aplican golpes de aire contra la superficie de la membrana por medio de una bombilla de jebe hasta que dicha superficie, brillante de por sí, se vuelva mate. Luego se coloca el balón sobre una superficie firme (mesa) y se sujetan los bordes de la membrana con los dedos de la mano izquierda, y con la mano derecha se aplica un portaobjetos, superficie contra superficie, y se presiona suavemente hasta deformar el balón; entonces se retira bruscamente el portaobjetos quedando estampada en la superficie del vidrio la capa epitelial descada. Algunas veces puede ser necesario repetir la maniobra para obtener éxito.

B. *Impresión de la capa alantoidea* (entodermo)

Para obtener impresiones de la capa alantoidea, todo el fragmento de cáscara conteniendo la membrana se introduce en la cámara de fijación

por un minuto. Inmediatamente después se despega la membrana de la cáscara y se sumerge en solución de Ringer; luego se la coloca extendida encima del balón de jebe, por su cara ectodérmica; el resto del procedimiento es igual al descrito anteriormente.

Si las impresiones se repiten después que han sido despegadas las capas epiteliales, se adhieren a la superficie del vidrio numerosas células alargadas, las que corresponden a fibroblastos de la capa mesodérmica.

Se pueden obtener impresiones del epitelio externo del saco de la yema y del amnios, directamente, sin necesidad de montarlos en un balón, desde que ellos son órganos llenos de líquido.

El método fue también aplicado a membranas en las que se hizo cambio de cámara siguiendo el clásico y muy conocido método; las impresiones fueron obtenidas seriadamente del piso de la falsa cámara.

Las impresiones así obtenidas pueden dejarse secar al aire y luego colorarlas como si se tratara de frotises de sangre, con Leishman, Whright o Giemsa; o si no pueden ser coloreadas con hematoxilina-eosina previa fijación con el líquido de Carnoy. Nosotros preferimos emplear los vapores de formol como fijador y colorante de Giemsa para la coloración, siguiendo una técnica que será dada a conocer en otra oportunidad.

Paralelamente y con propósitos de control y comparación hicimos cortes histológicos de membranas fijadas en 5% de formol, deshidratadas e incluidas en parafina, siguiendo la clásica técnica histológica.

Un punto importante se relaciona con el balón de jebe; sus paredes deben ser extremadamente delgadas y se le llena de agua hasta que su tamaño sea ligeramente mayor que el de un huevo de gallina; de esta manera se obtienen balones blandos. Según nuestra experiencia, los mejores resultados se obtienen con balones lo más blandos posibles. En el mercado se pueden obtener los de marca "Sultán" (Akwel Corp., Akron, Ohio, U.S.A.).

RESULTADOS

Con el método que acabamos de describir nos ha sido posible separar grandes áreas de ectodermo y entodermo de su lecho mesodérmico y estamparlos en portaobjetos. Después de colorear con Giemsa la capa

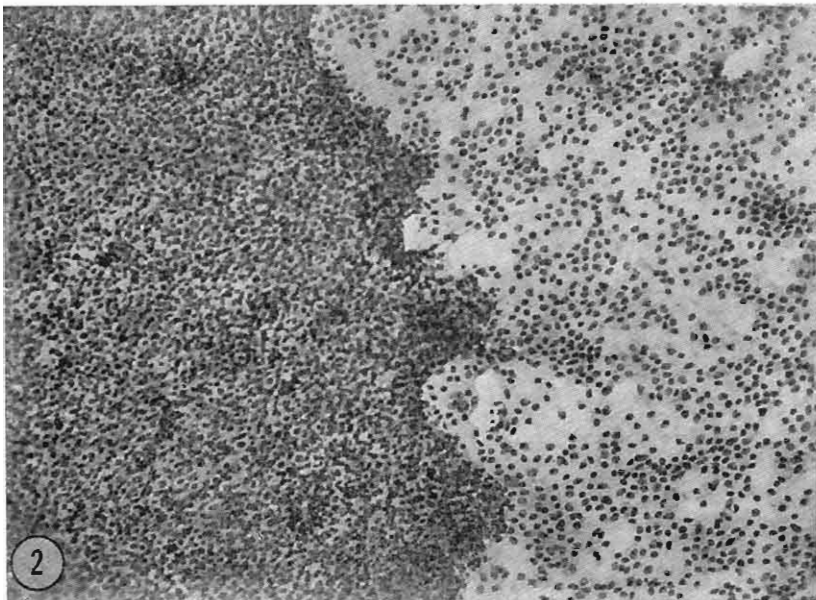
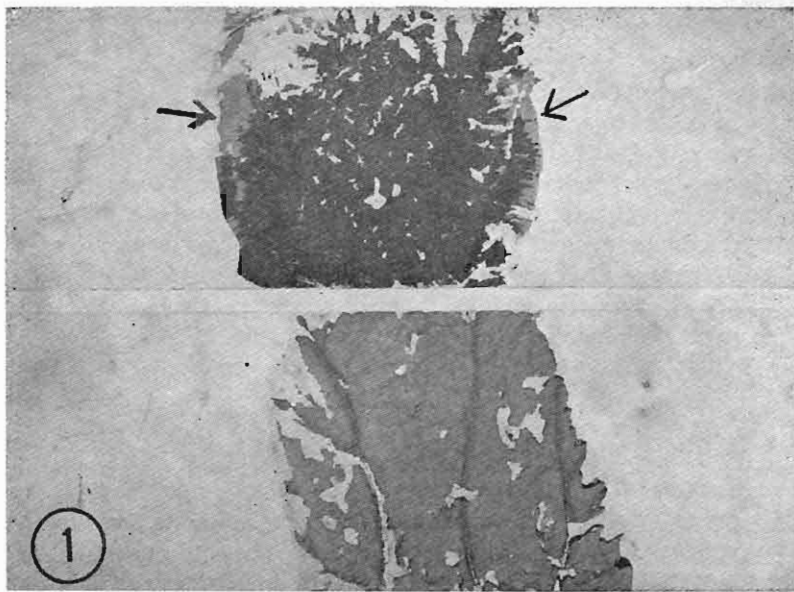


Fig. N° 1. Capas epiteliales de la membrana corio-alantoidea impresas en portaobjetos, de embrión de gallina de 12 días de edad; tamaño natural; coloración con Giemsa. Arriba: capa ectodérmica mostrando un sector marginal señalado por flechas, correspondiente (en observación microscópica) a su componente "supra-capilar". Abajo: capa ectodérmica mostrando claramente huellas de vasos.

Fig. N° 2. Capa ectodérmica a una ampliación de 102.7 X. A la izquierda: la capa en su completo espesor mostrando su característica estructura celular densa. A la derecha: el sector "supra-capilar" compuesto de una sola capa de células.

coriónica aparece de un color azul-rojizo oscuro (capa gruesa) y la capa alantoidea de un color azul-rojizo claro (capa delgada) (Fig. 1). La superficie de estas membranas muestra habitualmente trazos vasculares. Las membranas de embriones de más de 15 días de edad, frecuentemente no dan buenas impresiones, debido a que son más gruesas y más duras que las de embriones tiernos. La exposición excesiva a los vapores de formol también hace disminuir la adhesividad al vidrio.

Con el método se produce la distorsión de solamente una insignificante parte de la población celular.

A. *Capa coriónica*

Para comprender qué es lo que se ve frontalmente con el microscopio, nosotros debemos recordar que esta capa, desde el punto de vista histológico, consiste en una red capilar empotrada en una capa de células epiteliales, lo cual ha sido demostrado mediante cortes histológicos transversales (Danchakoff, 1917; Nauck y Nasseman, 1953; Borysco y Bang, 1953). Nosotros vamos a denominar "capa supra-capilar" a la capa de células epiteliales situadas por encima de la red capilar y en contacto directo con la membrana blanca de la cáscara; y "capa sub-capilar" a la situada por debajo de la red capilar y reposando directamente en el lecho mesodérmico. Puede suceder que queden impresas en el vidrio áreas intactas de ectodermo (comprendiendo ambas capas, la supracapilar, y la capilar) o solamente parte de él, el epitelio supracapilar, especialmente cuando las impresiones son hechas de membranas de embriones de aproximadamente 12 días de edad (Figs. 1 y 2).

La "capa supra-capilar" consta de una sola fila de células epiteliales cuyos protoplasmas tienden a ser anchos y los núcleos a ser pequeños conforme van pasando los días. El nucleolo puede ser simple o doble. Con los vapores de formol como fijador y con la subsiguiente coloración con Giemsa, en la parte central de los nucleolos aparece un punto azul oscuro. La "capa supracapilar" está condenada a desaparecer; se encuentra bien desarrollada entre los 10 y 13 días, pero en los días subsiguientes la población celular tiende a disminuir de tal manera que al décimo-quinto día se encuentran solamente algunos restos y a partir del décimo-sexto día ya no se ve nada. Esto significa que la red capilar establece contacto directo con la membrana de la cáscara, de tal manera que las impresiones correspondientes ya no muestran más a la "capa supra-capilar".

La red capilar del ectodermo se identifica por la presencia de eritrocitos en la luz de los vasos capilares y cuyas paredes están constitui-

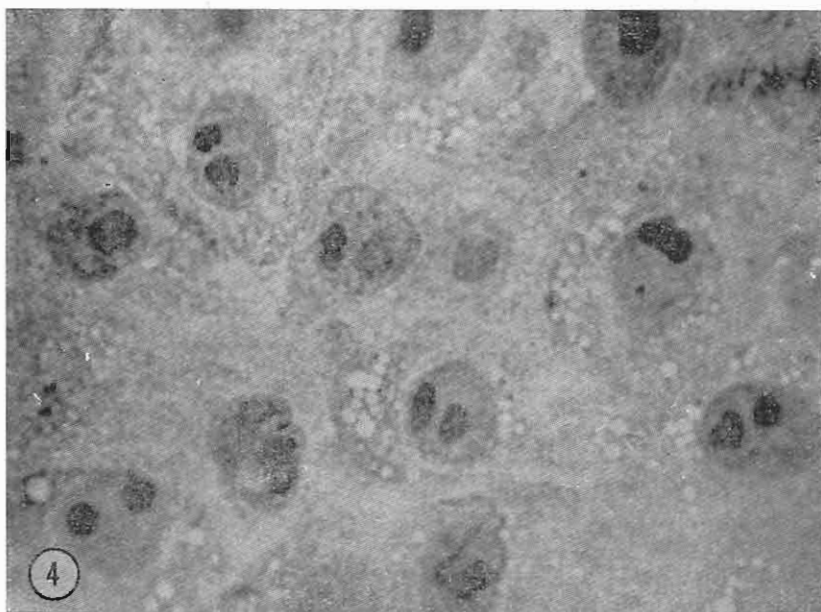
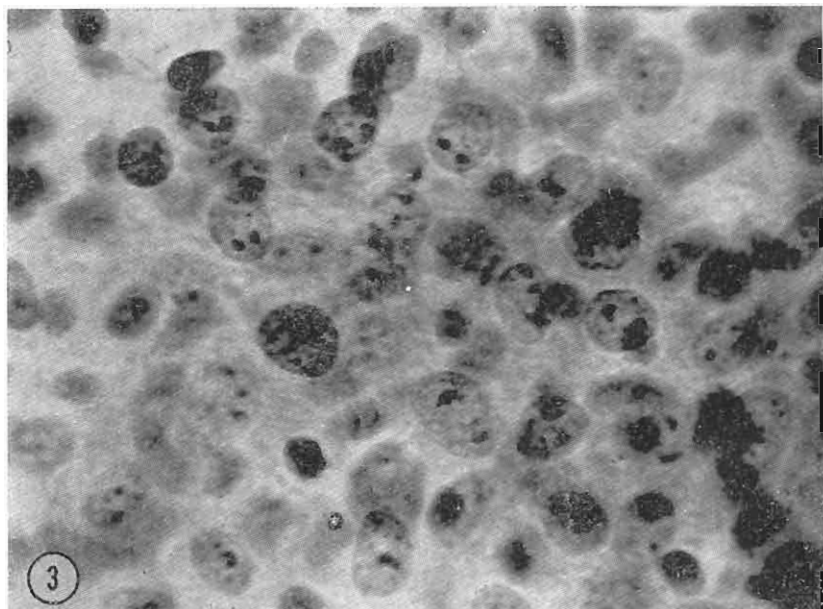


Fig. N° 3. Capa ectodérmica a una amplificación de 969 X; corresponde a la capa en su espesor completo (sector izquierdo de la Fig. 2). Note que las células se encuentran situadas a diferentes planos.

Fig. N° 4. Capa ectodérmica correspondiente al piso de la falsa cámara, a las 48 horas de la creación de la cámara. Los células epiteliales aparecen mostrando nucleolos prominentes y acidófilos, así como inclusiones intracitoplasmáticas en cantidad abundante.

das de células epiteliales con núcleos alargados. Los espacios de la malla o red capilar (espacios intercapilares) tienen un diámetro aproximado de 15 micras.

La "capa subcapilar" está constituida de células epiteliales con núcleo grande y ovoide y prominente nucleolo simple o doble; dichas células se encuentran situadas en diferentes planos.

En el ectodermo pueden verse también figuras de mitosis e histiocitos dispersos.

B. *Capa alantoidea*

La cantidad de núcleos, en observaciones microscópicas frontales, es mucho menor que lo que se ve en áreas equivalentes de capa ectodérmica (Figs. 2, 3, 5 y 6). Las células epiteliales poseen un tamaño considerable así como los correspondientes núcleos, los cuales contienen nucleolos borrosamente visibles (Fig. 6). El citoplasma de las células tiene contornos definidos y se encuentra lleno de inclusiones acidófilas probablemente de naturaleza lipídica (Borysko y Bang, 1953). Se ven frecuentemente figuras de mitosis. Las células se disponen casi siempre en una sola capa (epitelio simple) y esto se confirma en las secciones histológicas transversales; sin embargo, pueden verse algunas áreas con tendencia a la estratificación.

C. *Membrana de la cámara artificial*

Las observaciones seriadas de impresiones del segmento de membrana correspondiente al piso de la falsa cámara muestran que la capa coriónica experimenta un proceso de atenuación y simplificación, pues se constatan los siguientes cambios:

1. La "capa supracapilar" degenera; el núcleo de sus células se torna pequeño y desaparece aproximadamente a las 24 horas.

2. Desaparece la red capilar.

3. Las células de la capa subcapilar no muestran alteración durante las tres primeras horas de hecho el cambio de cámara; entre tres y seis horas el núcleo es aproximadamente del mismo tamaño pero los nucleolos se agrandan notablemente y son basófilos; entre 20 y 48 horas tanto los núcleos como los nucleolos son grandes, y las figuras de mitosis son muy numerosas. En los días subsiguientes el tamaño de los núcleos disminuye, pero los nucleolos continúan grandes y se tornan definitivamente acidófilos (Fig. 4); muchos nucleolos muestran un halo perinuclear. El resultado final es la transformación de toda la capa ectodérmica en un epitelio simple muy semejante a la capa entodérmica, con

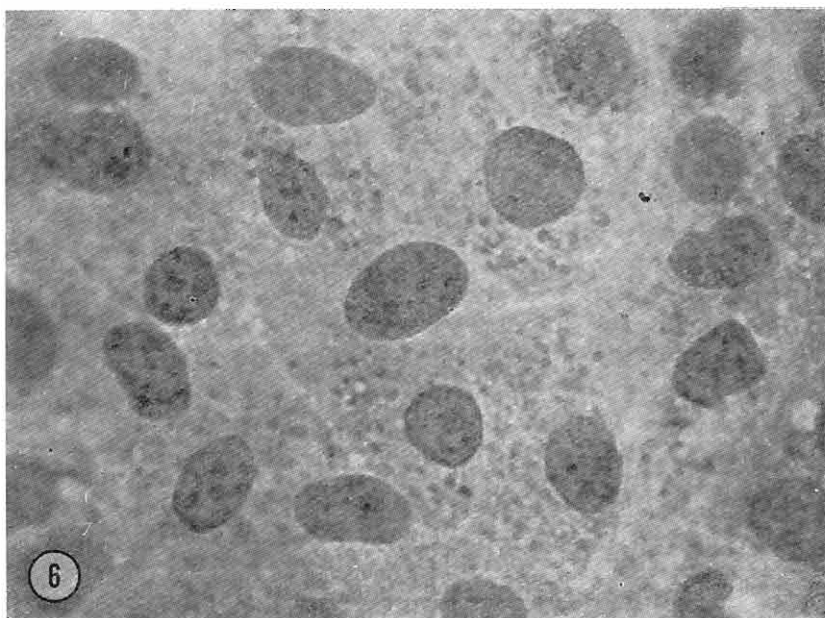
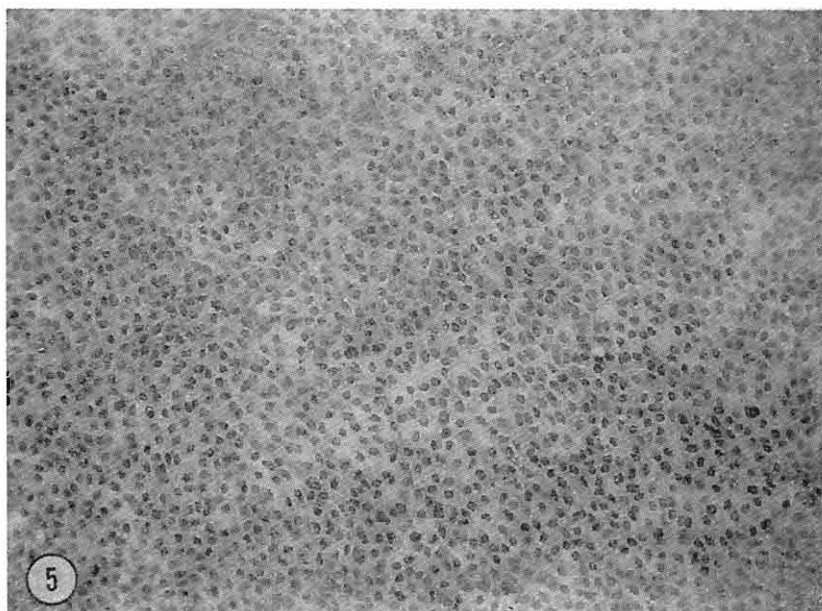


Fig. N° 5. Capa entodérmica a una ampliación de 102.7 X.
Fig. N° 6. Capa ectodérmica a una ampliación de 969 X mostrando abundantes inclusiones intracitoplasmáticas y ausencias de nucleolos o nucleolos apenas visibles.

abundantes inclusiones en el citoplasma de las células y cuyos contornos son definidos; pero se puede diferenciar de ésta (capa alantoidea) por la presencia de muy destacados nucleolos acidófilos en el interior de los correspondientes núcleos (Fig. 4).

DISCUSION

El método que hemos descrito permite separar las capas ectodérmica y entodérmica de la membrana corio-alantoidea y estudiarlas en observación frontal. Al lado de los cortes histológicos obtenidos con las técnicas clásicas, el método permite una mejor comprensión de la estructura y de la fisiología de la membrana corio-alantoidea y aún el hallazgo de ciertos detalles que hubieron de pasar desapercibidos. Con el método de las secciones transversales es posible ver solamente la sección de una sola fila de células, mientras que con el nuevo método se llega a ver una cantidad de células muchísimo mayor.

El hecho de que las capas epiteliales de la membrana corio-alantoidea pueden ser separadas fácilmente indica que la adhesión de ellas al lecho mesodérmico es débil. Frecuentemente se observa que cuando se despega la membrana corio-alantoidea de la cáscara quedan en la membrana blanca de la cáscara manchas de color marrón-rojizo; hemos podido demostrar que estas manchas corresponden a la capa ectodérmica mediante cortes histológicos y mediante la observación microscópica del legrado y coloración correspondiente. Aun en membranas fijadas con formol es posible separar las dos capas epiteliales con ayuda de finas pinzas, por tracción. La adhesividad de las mencionadas capas epiteliales al vidrio y la subsecuente tracción son suficientes para romper la unión laxa y lograr la impresión, a condición de que el contacto de las superficies (membrana-vidrio) sea firme, lo que significa que el líquido que tapiza la superficie epitelial sea eliminada mediante golpes de aire hasta que se torne mate; bajo esta condición creemos que la capa líquida que tapiza la superficie de la membrana tiene un espesor mínimo.

La población celular que constituye las capas ectodérmica y entodérmica se ve frontalmente con el aspecto de un cultivo de tejidos en "monolayer".

Hemos podido constatar que la creación de una cámara artificial en huevos embrionados produce en el área correspondiente al piso de la cámara un interesante proceso de simplificación en el que ciertos grupos de células (epitelio supracapilar y red capilar) desaparecen, mientras que las células epiteliales de la capa subcapilar sobreviven y se incrementan, formando al final un simple epitelio probablemente ya sin

función respiratoria. Este proceso está asociado con la producción de un extraordinario número de mitosis e hipertrofia nuclear y nucleolar que se inicia a las pocas horas de verificado el cambio de cámara. El aumento del volumen de los nucleolos ha sido relacionado con un proceso de síntesis rápida de proteínas (Hyden, 1947).

El método de las impresiones de la membrana corio-alantoidea ha permitido la individualización de una capa epitelial en contacto directo con la membrana de la cáscara, la que nosotros denominamos "capa supra-capilar". Esta capa degenera gradualmente y, finalmente, desaparece cuando el embrión llega a los 16 días de edad, permitiendo que la red capilar entre en contacto directo con la membrana de la cáscara. Danchakoff (1917) y Romanoff (1952) afirman que la red capilar entra en contacto directo entre el décimo-tercero y el décimo-quinto día. En verdad, ésta es la impresión que se tiene cuando las observaciones se hacen en cortes histológicos, tal como lo hizo Danchakoff (1917) y que nosotros también lo hicimos para compararlo con nuestro propio método.

Agradecimiento

El autor expresa su gratitud al Profesor E.G. Nauck, Director del Bernhard Nocht-Institut für Shiffs und Tropenkrankheiten, Hamburgo, Alemania, por la oportunidad que nos dio para trabajar durante dos años como investigador asociado visitante; al Dr. D. Peters, Dr. G. Nielsen y Dr. M. Boyer, miembros del Departamento de Virología, por su sutil labor crítica y discusión en el curso de las investigaciones.

BIBLIOGRAFIA

- Borysko, E. and F.B. Bang, 1953: The fine structure of the chorioallantoic membrane of the normal chick embryo. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 92: 257-289.
- Danchakoff, V., 1917: The position of the respiratory vascular net in the allantois of the chick. *Am. J. Anat.*, 21: 407-420.
- Hyden, H., 1947: The nucleoproteins in virus reproduction. *Cold Spring Harbor Symp.*, 12: 104-114.
- Nasemann, Th. and Pohlmeier, H. 1957: Eine einfache Flachschnittmethode der Chorioallantoismembran als diagnostisches Hilfsmittel in der Mikrobiologie. *Klin. Wochschr.*, 35: 287-291.
- Nauck, E.G. and Naseman, Th. 1952: Histologische Untersuchungen an normalen und mit Virus beimpften Corio-Allantois-Membranen Bebrüteter Hühnereier. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 3: 271-283.
- Romanoff, A.L., 1952: Membrane growth and function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 55: 288-301.
- Tamm, I. and Tyrrell, D.A. 1954: Influenza virus multiplication in the chorioallantoic membrane in vitro: kinetic aspects of inhibition by 5, 6-dichloro-1-B-D-Ribofuranosyl-Benzimidazole. *J. Exp. Med.*, 100: 541-562.
- Tyrrell, D.A.J.; Tamm, I.; Forsman, O.C. and Horsfall, F.L. Jr. 1954: A new count of allantoic cells of the 10-day chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86: 594-598.
- Cuadra, M.: Impresión de las capas de la membrana corio-allantoidea.